

CHRISTOPH W. WOENCKHAUS

## Synthesen und biochemische Eigenschaften wasserstoffübertragender Coenzymmodelle

Aus dem Institut für Biochemie im Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

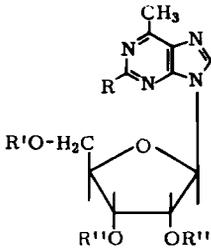
(Eingegangen am 29. Februar 1964)

Der Methyl- und  $\beta$ -Cyan-äthylester des Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphats werden durch Kondensation von Nicotinamidmononucleotid und den entsprechenden Phosphorsäureestern mit Trifluoressigsäureanhydrid oder Dicyclohexylcarbodiimid erhalten. Biochemisch reagieren sie in Dehydrogenasesystemen langsamer als Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD). Werden 6-Methyl- oder 2-Chlor-6-methyl-purin anstelle des Adenins im natürlichen Coenzym eingebaut, so weisen diese Verbindungen gleiche biochemische Eigenschaften wie das NAD auf. Die Purinribotid-5'-phosphate werden synthetisch, Nicotinamidmononucleotid wird durch Spaltung von natürlichem NAD mit Pyrophosphatase aus Kartoffeln gewonnen. Die Kondensation zu den Coenzymmodellen erfolgt in wäßrigem Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid. Die Wechselwirkung zwischen dem Purin- und Pyridinring wird spektroskopisch untersucht.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen dem Purin- und Nicotinamidteil im Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) (IX) haben wir beim Nicotinamid-[6-mercapto-purin]-dinucleotid und dessen Methyl-thioäther einen Anstieg des Purinextinktionskoeffizienten während der Reduktion des Nicotinamidteils beobachtet<sup>1)</sup>. Bei anderen Coenzymen absorbiert der Purinteil die gleiche Wellenlänge wie der Nicotinamidteil. Eine gegenseitige Beeinflussung beider Chromophore wird dadurch schwerer erkennbar. Um die Störung durch die Purinabsorption auszuschalten, haben wir den Methyl- und  $\beta$ -Cyan-äthylester (XIV und XIII) des Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphats synthetisiert. Die Verbindung XIII weist im oxydierten Zustand bei 264  $m\mu$  ein Maximum mit  $\epsilon = 4.6 \times 10^3$ , nach der Reduktion zum Dihydro-nicotinamid nur noch etwa  $0.6 \times 10^3$  auf. Dabei entsteht bei 335  $m\mu$  ein neues Maximum mit  $\epsilon = 6.1 \times 10^3$  ( $cm^2/mMol$ ). Purin-nicotinamid-dinucleotide sollten im oxydierten Zustand eine Extinktion aufweisen, die sich additiv aus den Anteilen des Purin- und Nicotinamidringes zusammensetzt. Nach der Reduktion zum Dihydrocoenzym sollte die Extinktion bei 264  $m\mu$  etwa der des Purinribotids entsprechen. Tatsächlich ist die Differenz der Extinktionswerte zwischen oxydiertem und reduziertem natürlichem Nicotinamid-adenin-dinucleotid geringer, nämlich  $3 \times 10^3$ . R. M. BOCK<sup>2)</sup> zeigte, daß erst nach Spaltung der Pyrophosphatbrücke der theoretische Wert erreicht wird.

<sup>1)</sup> G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS, K. SCHOLZ und H. FELLER, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

<sup>2)</sup> J. M. SIEGEL, G. A. MONTGOMERY und R. M. BOCK, Arch. Biochem. Biophysics **82**, 288 [1959].

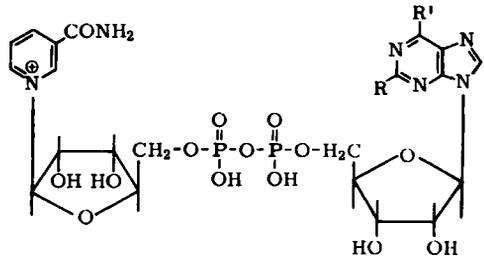
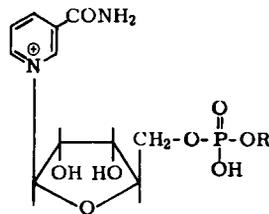


I: R = Cl, R' = R'' = Ac

II: R = H, R' = R'' = Ac

III: R = Cl, R' = R'' = H

IV: R = R' = R'' = H

V: R = Cl, R' = H, R'', R''' = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<VI: R = R' = H, R'', R''' = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<VII: R = Cl, R' = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, R'' = HVIII: R = R'' = H, R' = PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>IX: R = H, R' = NH<sub>2</sub> (NAD)X: R = Cl, R' = CH<sub>3</sub>XI: R = H, R' = CH<sub>3</sub>

XII: R = H

XIII: R = P(O)(OH)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CNXIV: R = P(O)(OH)OCH<sub>3</sub>

Es interessierte uns, inwieweit Substituenten am Purinring in 6- und 2-Stellung einen Einfluß auf die Wechselwirkung ausüben. Wir haben deshalb anstelle des Adenins 6-Methyl- und 2-Chlor-6-methyl-purin in das Coenzym eingebaut. Die Ergebnisse sind mit den Werten von anderen, schon vorher veröffentlichten Verbindungen<sup>1)</sup> in der Tab. zusammengefaßt. Der Unterschied zum natürlichen NAD ist bei allen purinhaltigen Coenzymmodellen gering und liegt am Rande des Meßfehlers. Für die gegenseitige Beeinflussung scheidet eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Säureamidgruppe im Nicotinamid und der Aminogruppe des Adenins aus, da der Ersatz der Aminogruppe durch Wasserstoff oder den Methylrest möglich ist, die keine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. Damit ist eine Extinktionsdifferenz von  $4 \times 10^3$  zwischen oxydierter und reduzierter Form bei 265 m $\mu$  zu erwarten, die aber nicht auftritt, was auf die Möglichkeit eines  $\pi$ -Komplexes deutet. Bei Nucleinsäuren bedingt die Wasserstoffbrückenbindung eine Verminderung des Extinktionskoeffizienten.

Alle purinhaltigen Coenzymmodelle zeigen gegenüber dem NAD biochemisch kaum einen Unterschied. Die MICHAELIS-Konstanten und Umsatzzahlen, gemessen an Hefe- und Leber-Alkoholdehydrogenasen, liegen in der Größenordnung des natürlichen Coenzym, ebenfalls die Cyanid- und Sulfid-Dissoziationskonstanten. G. PFLEIDERER und Mitarbb. konnten zeigen<sup>3)</sup>, daß erst die vollständige Entfernung des Adeninteils im NAD zu einem starken Abfall der biochemischen Aktivität führte.

<sup>3)</sup> G. PFLEIDERER, E. SANN und F. ORTANDERL, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 73, 39 [1963].

Biochemische Eigenschaften verschiedener Coenzymmodelle, gemessen an Hefe- und Leber-Alkoholdehydrogenase (ADH):  $K_M$  = Michaelis-Konstante in Mol/l, gemessen in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5;  $0,7 \times 10^{-6}$  m Enzym,  $6 \times 10^{-2}$  m Äthanol,  $0,2-2 \times 10^{-3}$  m Coenzym. UZ (Mol/Min.) = Maximale Umsatzzahl, ber. aus der Geraden nach H. LINEWEAVER und D. BURK<sup>4)</sup>.

Optische Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen, verglichen mit anderen, schon vorher veröffentlichten Werten:  $\epsilon_{ox}$  = Extinktionskoeffizient des oxydierten Coenzymmodells, gemessen im Absorptionsmaximum,  $\epsilon_{red 1}$  = des reduzierten Coenzymmodells, gemessen im Maximum der Purinabsorption,  $\epsilon_{red 2}$  = des reduzierten Coenzymmodells, gemessen im Absorptionsmaximum des Dihydropyrimidinid- und  $\epsilon_{red 3}$  = des Purinribotids, gemessen im Absorptionsmaximum.

Chemische Eigenschaften, Dissoziationskonstanten der Cyanid-<sup>5)</sup> und Sulfit-<sup>6)</sup>-Komplexe ( $K_{CN}$  und  $K_{SO_3}$ ), gemessen in Mol/l.

Substanz	$K_M$ ADH, Hefe	UZ Hefe	$K_M$ ADH, Leber	UZ Leber	Extinktionen ( $\epsilon \times 10^3$ cm <sup>2</sup> /mMol) $\pm 10\%$			$K_{CN}$	$K_{SO_3}$	
					$\epsilon_{ox}$	$\epsilon_{red 1}$	$\epsilon_{red 2}$			$\epsilon_{red 1}$
Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat-P <sub>2</sub> -methylster (XIV)	—	—	$5 \times 10^{-4}$	22	—	—	—	—	—	
Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat-P <sub>2</sub> [ $\beta$ -cyan-äthylester] (XIII)	$100 \times 10^{-4}$	100	$5 \times 10^{-4}$	20	4.6	0.6	6.1	—	4.0	$0.6 \times 10^{-2}$
Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphat-P <sub>2</sub>	$1000 \times 10^{-4}$	500	$5 \times 10^{-4}$	11	—	—	—	—	—	—
5''-ribose	$2.5 \times 10^{-4}$	20000	—	—	11.3	7.8	6.0	7.5	3.5	$0.9 \times 10^{-2}$
Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) (IX)	$2.5 \times 10^{-4}$	55000	$0.3 \times 10^{-4}$	410	18.0	15.0	6.2	15.0	3.0	$2.0 \times 10^{-2}$
Nicotinamid-[6-methyl-purin]-dinucleotid (XI)	$3.5 \times 10^{-4}$	20000	$0.3 \times 10^{-4}$	500	11.7	8.3	6.0	8.2	3.4	$0.35 \times 10^{-2}$
Nicotinamid-[2-chlor-6-methyl-purin]-dinucleotid (X)	$3 \times 10^{-4}$	20000	$0.15 \times 10^{-4}$	330	12.2	8.9	5.8	8.4	3.3	$0.6 \times 10^{-2}$
Nicotinamid-[6-mercaptopurin]-dinucleotid	$6 \times 10^{-4}$	10000	—	—	23.2	28.7	6.2	—	—	$1.5 \times 10^{-2}$
Nicotinamid-[6-methyl-mercapto-purin]-dinucleotid	$6.7 \times 10^{-4}$	9000	—	—	(310 m $\mu$ ) 16.6	(295 m $\mu$ ) 18.8	—	—	—	$1 \times 10^{-2}$

4) J. Amer. chem. Soc. **56**, 658 [1934].

5) K. WALLENFELS und H. DIEKMANN, Liebigs Ann. Chem. **621**, 166 [1959].

6) G. PFLEIDERER, E. SANN und A. STOCK, Chem. Ber. **93**, 3083 [1960].

In den beiden Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphatestern XIII und XIV wurden noch kleinere Coenzymbruchstücke dargestellt, die in ihrem biochemischen Verhalten zwischen dem Nicotinamidmononucleotid und dem adeninfreien Coenzymrest stehen. Aufgrund des großen Unterschiedes zwischen purinfreien und purinhaltigen Coenzymmodellen im enzymatischen Test sind wir damit beschäftigt, den Stickstoff in den heterocyclischen Ringen durch Kohlenstoff zu ersetzen. Die ersten Untersuchungen an dem Benzimidazolanalogen von NAD zeigen, daß es im enzymatischen Test langsamer reagiert als das Coenzym. Pyrophosphatase aus Kartoffeln spaltet die Pyrophosphatbrücke dieser Verbindung nicht.

Zur Synthese des 6-Methyl- und 2-Chlor-6-methyl-purins nach S. GABRIEL und J. COLMAN<sup>7)</sup> soll noch folgendes bemerkt werden: Die Überführung von 5-Nitro-6-methyl-uracil in 2,4-Dichlor-5-nitro-6-methyl-pyrimidin gelang mit Phosphoroxychlorid in Dimethylanilin bei Atmosphärendruck<sup>8)</sup> in guter Ausbeute. Die Hydrierung von 2-Chlor-4-amino-5-nitro-6-methyl-pyrimidin mit Palladium/Tierkohle oder Raney-Nickel lieferte 4,5-Diamino-6-methyl-pyrimidin nur zu 10% d. Th.<sup>8)</sup>; deshalb wurde wie früher mit Phosphoniumjodid in konz. Jodwasserstoffsäure reduziert. 2-Chlor-4,5-diamino-6-methyl-pyrimidin wurde durch Reduktion mit Zinn(II)-chlorid in Salzsäure hergestellt<sup>7)</sup>. Der Ringschluß zu den Purinen erfolgte mit Orthoameisensäure-äthylester und Ameisensäure<sup>9)</sup> in guter Ausbeute. Die Quecksilbersalze der Purinbasen setzten wir mit 1-Chlor-*O*-triacetyl-ribofuranose zu den acetylierten Ribosiden I und II um.

Auf diesem Wege stellte G. B. BROWN das 6-Methyl-purinribosid her<sup>10)</sup>. Nach dem Entacetylieren zu III und IV haben wir die 2'.3'-Stellung durch Isopropylidierung geschützt und anschließend 6-Methyl- (VI) und 2-Chlor-6-methyl-9-[ $\beta$ -D-2'.3'-*O*-isopropyliden-ribofuranosyl]-purin (V) nach G. M. TENER<sup>11)</sup> mit  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat in 5'-Stellung phosphoryliert. Die Purinribotid-5'-phosphate wurden in wäßrigem Pyridin nach A. R. TODD in 15–25% d. Th. zu den Coenzymmodellen X und XI kondensiert<sup>12)</sup> und durch Gradientenelution an Dowex-1-formiat-Säulen mit Ameisensäure steigender Konzentration gereinigt. Aus konzentrierter Lösung konnten die Coenzymmodelle durch Fällen mit Aceton in fester Form erhalten werden. Durch Kondensation des Nicotinamidmononucleotids (XII) mit  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat erhielten wir analog den  $\beta$ -Cyan-äthylester XIII in 5-proz. Ausbeute. Die Nitrilgruppe im Coenzymmodell konnte man im IR-Spektrum bei 2250/cm erkennen. Den Methyl-ester XIV erhielten wir aus Methylphosphat und XII in Trifluoressigsäureanhydrid<sup>13)</sup>; denn die Ausbeute nach dem vorher beschriebenen Verfahren lag hier unter 0.5%. Die Verbindung wurde nicht rein erhalten. XII wurde nach G. W. E. PLAUT und K. A. PLAUT<sup>14)</sup> durch Spaltung von Nicotinamid-adenin-dinucleotid mit einer Kartoffel-Pyrophosphatase hergestellt.

7) Ber. dtsh. chem. Ges. 34, 1234 [1901].

8) CH. W. WOENCKHAUS, Dissertat. Univ. Heidelberg 1960.

9) N. RAY-PRASRD, C. WAYNE-NOEL und R. K. ROBINS, J. Amer. chem. Soc. 81, 193 [1959].

10) M. P. GORDON, K. S. WELIKY und G. B. BROWN, J. Amer. chem. Soc. 79, 3245 [1957].

11) J. Amer. chem. Soc. 83, 159 [1961].

12) N. A. HUGHES, C. W. KENNER und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] 1957, 3733.

13) L. SCHUSTER, N. O. KAPLAN und F. E. STOLZENBACH, J. biol. Chemistry 215, 195 [1955].

14) Arch. Biochem. Biophysics 48, 189 [1954].

Alle Dinucleotide wurden elektrophoretisch auf Einheitlichkeit geprüft. Durch Ribose-<sup>15)</sup> und Phosphatanalyse<sup>16)</sup> wurde das Verhältnis Phosphat zu Ribose gefunden und der Wassergehalt bestimmt. Durch Aufnahme der UV-Spektren vor und nach der Cyanidreaktion wurde die Anwesenheit beider Chromophore festgestellt.

Für die Überlassung von Chemikalien möchte ich dem CHEMISCHEN WERK HÜLS, der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK und den FARBENFABRIKEN BAYER danken.

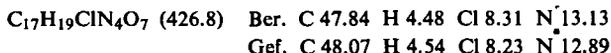
### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die optischen Messungen wurden im Beckman DK II und Zeiss-Spektral-Photometer PMQ II vorgenommen. Die enzymatische Reduktion wurde mit Leber- und Hefe-Alkoholdehydrogenasen der Firma Boehringer & Soehne GmbH in 0.2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9.5 durchgeführt und mit dem selbstregistrierenden Photometer „Eppendorf“ verfolgt.

*2-Chlor-5-nitro-4-amino-6-methyl-pyrimidin*: 35 g *5-Nitro-6-methyl-uracil* werden mit 60 ccm *Dimethylanilin* und 200 ccm *Phosphoroxychlorid*<sup>8)</sup> erhitzt. Unter Aufschäumen tritt heftige Reaktion ein, die nach Unterbrechen der Wärmezufuhr rasch abklingt. Etwa  $\frac{2}{3}$  des überschüss. Phosphoroxychlorids werden i. Vak. entfernt, und der sirupöse Rückstand wird auf 1000 g Eis gegossen. Nach 12 Stdn. saugt man den Kristallkuchen ab und trocknet ihn über  $P_4O_{10}$  und KOH i. Vak. Nur geringe Mengen des *2.4-Dichlor-5-nitro-6-methyl-pyrimidins* gehen dabei durch Sublimation verloren. Das Rohprodukt wird mit heißem Petroläther (60–80°) erschöpfend extrahiert, der Petroläther i. Vak. entfernt und der kristallisierende Rückstand in 60 ccm heißem Äthanol gelöst und unter Rühren und Kühlen auf 10–20° mit einer gesätt. *Ammoniak/Äthanol-Lösung* bis zum Bestehenbleiben der alkalischen Reaktion versetzt. Nach beendeter Reaktion wird das auskristallisierte Produkt abgesaugt und nach Trocknen mit Xylol extrahiert, aus dem das *2-Chlor-5-nitro-4-amino-6-methyl-pyrimidin* in dichten, rosa Kristalldrüsen ausfällt. Ausb. 10 g (38%, bez. auf *5-Nitro-6-methyl-uracil*), Schmp. 171°.

*6-Methyl-purin*: 10.0 g *4.5-Diamino-6-methyl-pyrimidin* werden mit 100 ccm *Orthoameisensäure-äthylester* und 25 ccm 98–100-proz. *Ameisensäure* 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abdampfen des Ester/Säure-Gemisches kristallisiert der Sirup. Das Rohprodukt wird durch Sublimation gereinigt. Ausb. 9.0 g (85%), Schmp. 236°.

*2-Chlor-6-methyl-9-[\beta-D-2'.3'.5'-O-triacetyl-ribofuranosyl]-purin (I)*: 15 g *2-Chlor-6-methyl-purin* werden in 250 ccm Wasser mit 2.2 g Natriumhydroxyd versetzt. Dazu werden 16 g *Quecksilber(II)-chlorid* in Äthanol/Wasser (1:1) gegeben. Das farblose, voluminöse *Quecksilbersalz* wird abfiltriert und i. Vak. getrocknet (35 g). 15.5 g des Salzes werden in 250 ccm Xylol suspendiert und azeotrop getrocknet. Nach Zugabe von 15 g *1-Chlor-triacetylribofuranose* kocht man die Mischung 3–4 Stdn. unter Rückfluß und destilliert das Xylol i. Vak. ab. Den Rückstand extrahiert man mit 3mal 100 ccm Chloroform, wäscht die Extrakte zur Entfernung von Quecksilbersalzen mit 30-proz. Kaliumjodidlösung und trocknet mit Natriumsulfat. Nach Abdestillieren des Chloroforms i. Vak. konnte *I* aus Äthanol umkristallisiert werden. Ausb. 11 g (70%), Schmp. 170–174°.



<sup>15)</sup> E. VOLKIN und W. E. COHN, *Methods of biochem. Analysis* Bd. 1, S. 298, Interscience Publishers, New York 1957.

<sup>16)</sup> M. MARTLAND und R. ROBINS, *Biochem. J.* 20, 848 [1926].

6-Methyl-9-[ $\beta$ -D-2'.3'.5'-O-triacetyl-ribofuranosyl]-purin (II) wurde wie vorstehend synthetisiert und ist, wie in l. c.<sup>10)</sup> beschrieben, nicht kristallisiert.

2-Chlor-6-methyl-9-[ $\beta$ -D-ribofuranosyl]-purin (III): 10.0 g I werden in 50 ccm Äthanol mit 50 ccm Ammoniak/Äthanol (15% NH<sub>3</sub>) versetzt und fest verschlossen 48 Stdn. unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur aufgehoben, wobei I vollständig in Lösung geht. Ammoniak und Äthanol werden i. Vak. entfernt; der zurückbleibende Sirup kristallisiert langsam durch. Ausb. 5.5 g (80%) III, Schmp. 188–191°.

C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (300.7) Ber. C 43.93 H 4.36 Cl 11.79 N 18.63  
Gef. C 43.81 H 4.42 Cl 11.54 N 18.45

6-Methyl-9-[ $\beta$ -D-ribofuranosyl]-purin (IV) wurde wie vorstehend hergestellt und besaß die in l. c.<sup>10)</sup> angegebenen Eigenschaften.

2-Chlor-6-methyl-9-[ $\beta$ -D-2'.3'-O-isopropyliden-ribofuranosyl]-purin (V): 19.1 g *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat (über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. getrocknet) werden unter Rühren zu einer Suspension von 3.0 g III in 100 ccm absol. Aceton gegeben. Das Ribosid löst sich nach kurzer Zeit auf. Man läßt 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehen und gießt dann in eine Mischung aus 200 g Eis in 200 ccm 0.5*n* NH<sub>3</sub>. Nach 2 Stdn. bei Raumtemperatur wird bei 40° i. Vak. zur Trockne eingengt und der Rückstand über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> i. Vak. getrocknet. Aus dem Kristallkuchen erhält man durch Extraktion mit heißem Aceton, Abdampfen des Lösungsmittels und Umkristallisieren aus Wasser die Isopropylidenverbindung V. Ausb. 2.8 g (80%), Schmp. 135–136°.

C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (340.8) Ber. C 49.34 H 5.03 Cl 10.40 N 16.45  
Gef. C 49.43 H 5.04 Cl 10.53 N 16.46

6-Methyl-9-[ $\beta$ -D-2'.3'-O-isopropyliden-ribofuranosyl]-purin (VI): Aus 1.2 g IV wurden wie vorstehend 1.2 g VI hergestellt. Ausb. 90%, Schmp. 152–154°.

C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (316.3) Ber. C 54.89 H 5.92 N 18.29 Gef. C 55.14 H 5.85 N 18.28

2-Chlor-6-methyl-9-[ $\beta$ -D-ribofuranosyl]-purin-5'-phosphat (VII): 680 mg V werden in 20 ccm Pyridin mit 8 ccm einer  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat-Lösung (aus 16.1 g Barium- $\beta$ -cyan-äthylphosphat nach Behandeln mit Dowex-50-H<sup>+</sup>, 200–400 mesh, und Lösen in 50 ccm Pyridin<sup>11)</sup>) versetzt. Die Lösung wird bei 30° i. Vak. zur Trockne eingengt und mit absol. Pyridin wieder aufgenommen. Dieser Vorgang wird noch 2 mal wiederholt; dann wird in 20 ccm absol. Pyridin mit 4 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 24 Stdn. bei 20° werden zur Kristallsuspension 20 ccm Wasser gegeben, und nach 30 Min. wird bei 30° i. Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand mit 100 ccm 0.4*n* LiOH versetzt und 2 Stdn. bei 40° stehengelassen. Anschließend filtriert man vom Ungelösten, gibt das Filtrat auf eine Dowex-50-H<sup>+</sup>-Säule (2 × 30 cm), wäscht mit Wasser, bis im Eluat keine Absorption bei 260 m $\mu$  mehr zu messen ist, und engt es bei 30° i. Vak. auf 50 ccm ein. Aus der konz. Lösung wird durch Neutralisieren auf pH 7.5 mit Bariumhydroxyd-Lösung anorganisches Phosphat gefällt, das abzentrifugiert wird. Man versetzt den Überstand mit der doppelten Menge 96-proz. Äthanol, wobei das Bariumsalz des Purinribotids ausfällt. Das Salz wird zentrifugiert und mit Äthanol und Aceton gewaschen. Aus diesem gewinnt man das freie Ribotid durch Lösen in einer Dowex-50-H<sup>+</sup>-Suspension und Elution von einer Dowex-50-H<sup>+</sup>-Säule (2 × 30 cm). Nach dem Eindampfen des Eluats bei 30° i. Vak. auf etwa 3 ccm wird mit kaltem Aceton farbloses VII gefällt. Das Nucleotid war mit wenig  $\beta$ -Cyan-äthylphosphat verunreinigt. Zur Phosphat- und Ribosebestimmung wurde es papierelektrophoretisch in 0.1*m* Tris/Ameisensäure-Puffer, pH 8, gereinigt. Ausb. 320 mg Bariumsalz (60%). Das Bariumsalz war 86-proz.; Ribose:Phosphat gef. 1.0:0.95.  $\lambda_{\max}$  268 m $\mu$  (pH 6.5).

6-Methyl-9-[ $\beta$ -D-ribofuranosyl]-purin-5'-phosphat (VIII): Auf gleichem Wege wie VII wurde aus 1 g VI 1 g des Bariumsalzes von VIII erhalten (60%). Durch Austausch der Barium- gegen

Wasserstoff-Ionen erhielt man das freie Ribotid VIII, das nach der Acetonfällung aus wenig Wasser in farblosen Nadeln kristallisierte. Ausb. 300 mg (40%),  $\lambda_{\max}$  260 m $\mu$  (pH 5.6).

$C_{11}H_{14}N_4O_7P$  (346.5) Ber. C 38.16 H 4.36 N 16.18 P 8.95  
Gef. C 38.42 H 3.98 N 16.09 P 9.28

*1-[ $\beta$ -D-Ribofuranosyl]-benzimidazol-5'-phosphat (XII, Benzimidazolyl-(1)- statt des Nicotinamids):* Aus *1-[ $\beta$ -D-Ribofuranosyl]-benzimidazol* stellen wir nach Isopropylidierung der 2'.3'-Stellung das Ribotid auf dem oben beschriebenen Weg her. Aus 1.0 g *1-[ $\beta$ -D-2'.3'-O-Isopropyliden-ribofuranosyl]-benzimidazol* erhält man 400 mg freies *Ribotid-5'-phosphat* (40%).

$C_{12}H_{15}N_2O_7P$  (330.2) Ber. C 43.64 H 4.58 N 8.48 P 9.38  
Gef. C 43.54 H 4.63 N 8.55 P 9.61

UV-Spektrum bei pH 5.6:  $\lambda_{\max}$  275 ( $\epsilon = 4.8 \times 10^3$  cm<sup>2</sup>/mMol), 268 ( $5.3 \times 10^3$ ), 262 ( $4.8 \times 10^3$ ), 242 m $\mu$  ( $5.8 \times 10^3$ ).

*Nicotinamid-[2-chlor-6-methyl-purin]-dinucleotid (X):* Zur Lösung von 200 mg VII und 100 mg *Nicotinamidmononucleotid* (XII) in 4.2 ccm Wasser und 20 ccm Pyridin werden 3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* gegeben. Man läßt 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen, filtriert dann den ausgefallenen Harnstoff ab und wäscht ihn mit 1 ccm heißem Wasser. Waschwasser und Filtrat werden vereinigt und erneut mit 2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis nach 5–7 Tagen nur noch geringe Mengen Cyclohexylharnstoff gebildet werden. Man gibt anschließend in 200 ccm Wasser, läßt 2 Stdn. bei 20° stehen, filtriert und schüttelt das Filtrat 3 mal mit 150 ccm Chloroform aus. Die wäbr. Phase wird bei 30° i. Vak. auf 3 ccm eingengt und auf eine Dowex-1-Formiat-Säule (30  $\times$  2 cm) gegeben. Zunächst werden mit Wasser Nicotinamidmono- und -dinucleotid eluiert. Anschließend wird Ameisensäure steigender Konzentration (500-ccm-Mischgefäß) aufgegeben, wobei die Coenzymmodelle meist bei 0.5–1 n HCO<sub>2</sub>H erscheinen. Das Dinucleotid X wird durch die Addition von Cyanid an die 4-Stellung des Nicotinamidringes und das damit verbundene Maximum bei 330 m $\mu$  sowie das der Purinabsorption erkannt. Nachdem die entsprechende Fraktion bei 30° i. Vak. auf 3 ccm eingedampft ist, wird das Coenzymanaloge mit kaltem Aceton gefällt. Die zuerst als farbloses Harz ausfallende Verbindung X wird durch nochmaliges Umfällen feinkörnig. Die Substanz ist meist 85-proz., festgestellt durch Ribose- und Phosphatbestimmung. Ausb. 25 mg (12%). Die Verbindung ist pherographisch einheitlich. Ribose : Phosphat gef. 1 : 0.95.  $\lambda_{\max}$  267 (oxydierte Form, pH 9.5), 339 und 268 m $\mu$  (reduzierte Form, pH 9.5).

Nach dieser Vorschrift wurden außerdem hergestellt:

*Nicotinamid-[6-methyl-purin]-dinucleotid (XI):* Ausb. 40 mg (20%) farbloses Pulver, pherographisch einheitlich. Ribose : Phosphat gef. 1 : 1.  $\lambda_{\max}$  261 (oxydierte Form, pH 9.5), 338.5 und 260 m $\mu$  (reduzierte Form, pH 9.5).

*Nicotinamid-benzimidazol-dinucleotid (IX, Benzimidazolyl-(1) statt des Adenins):* Ausb. 60 mg (30%) farbloses Pulver, pherographisch einheitlich. Ribose : Phosphat gef. 1 : 1.  $\lambda_{\max}$  278, (Schulter 272), 263, 242 (oxydierte Form, pH 9.5), 336, 279, 271, 242 m $\mu$  (reduzierte Form, pH 9.5).

*Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphorsäure-P<sub>2</sub>-[ $\beta$ -cyan-äthylester] (XIII):* Ausb. 10 mg (5%) farbloses Pulver, pherographisch einheitlich. Ribose : Phosphat gef. 1 : 2.  $\lambda_{\max}$  265 (oxydierte Form, pH 9.5), 335 m $\mu$  (reduzierte Form, pH 9.5).

*Nicotinamidribotid-5'-pyrophosphorsäure-P<sub>2</sub>-methylester (XIV):* 135 mg *Nicotinamidmononucleotid* XII und 200 mg *Bariumsalz des Methylphosphats* werden in 2 ccm *Trifluoressigsäureanhydrid* gelöst. Nach 24 Stdn. bei Raumtemperatur wird überschüss. Anhydrid i. Vak. über

KOH und  $P_4O_{10}$  entfernt. Das zurückgebliebene Harz wird erneut mit 1 ccm Trifluoracetanhydrid behandelt, wie vorher getrocknet und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Die Trifluoracetylreste werden bei 0° in 20 ccm 5-proz. *Ammoniak* entfernt. Dann säuert man durch Zugabe von Dowex-50-H<sup>⊕</sup> an, befreit durch Waschen über eine Dowex-50-H<sup>⊕</sup>-Säule von Bariunionen, konzentriert das Eluat bei 30° i. Vak. auf 1 ccm und arbeitet durch Papier-electrophorese bei pH 8 (0.1 m Tris/Acetat-Puffer) mit 40 V/cm auf. Trotz mehrfacher Pherographie konnte diese Verbindung nicht rein erhalten werden. Nach Elution vom Papier, Entfernung der Kationen an einer Dowex-50-H<sup>⊕</sup>-Säule, Konzentrieren des Eluats bei 30° i. Vak. auf 1 ccm und Fällen mit Aceton erhielt man 22 mg (15%) eines braunen Harzes, das sich an der Luft tiefdunkel färbte.  $\lambda_{\max}$  265 (oxydierte Form, pH 8.5), 335 m $\mu$  (reduzierte Form, pH 7.0).